

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer: **0 350 690
A2**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21)

Anmeldenummer: 89111538.8

(51)

Int. Cl. 4: **C07K 15/06 , A61K 39/395**

(22)

Anmeldetag: 24.06.89

(30)

Priorität: 14.07.88 DE 3823804

(43)

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
17.01.90 Patentblatt 90/03

(64)

Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE

(71)

Anmelder: **BASF Aktiengesellschaft**
Carl-Bosch-Strasse 38
D-6700 Ludwigshafen(DE)

(72)

Erfinder: **Moeller, Achim, Dr.**
Wilhelm-Busch-Strasse 51
D-6703 Limburgerhof(DE)
Erfinder: **Emling, Franz, Dr.**
Valentin-Bauer-Strasse 22
D-6700 Ludwigshafen(DE)
Erfinder: **Kurfuerst, Manfred, Dr.**
Anilinstrasse 71
D-6733 Hassoeh(DE)
Erfinder: **Meyer, Thomas, Dr.**
Gruenerstrasse 14 a
D-6700 Ludwigshafen(DE)

(54)

Neutralisation der In vitro- und In vivo-toxischen Eigenschaften von TNF-alfa durch monoklonale Antikörper und die davon abgeleiteten Fragmente.

(57)

Es werden Fragmente des monoklonalen Antikörpers MAK 195 beschrieben, die sich zur Bekämpfung von Krankheiten eignen.

EP 0 350 690 A2

chen zur Neutralisation der zytotoxischen Aktivität von TNF- α durch das F(ab)₂- bzw. F(ab)-Fragment des monoklonalen Antikörpers mAK 195 wurde eine Konzentration an TNF gewählt, bei der mindestens 90 % der Zellen lysierten. Die Antikörper-Fragmente wurden in Medium auf eine Konzentration von 2 μ g/ml eingestellt und in eins zu zwei Schritten in Mikrotiterplatten verdünnt. Zu jeder Antikörperfragmentlösung (0,1 ml) wurden 0,05 ml rekombinanter TNF (2 ng/ml) gegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte Zugabe von 50 000 L929-Zellen in 0,05 ml Medium und nach einer Inkubation von 20-24 h im Brutschrank bei 37 °C wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt.

Der schützende Effekt der Antikörperfragmente zeigte sich durch die Färbbarkeit von intakten Zellen. Die Fragmente hemmen die zytotoxische Aktivität von TNF.

Beispiel 2

In vivo Neutralisation von human TNF- α

Der schützende Effekt der F(ab)₂- und F(ab)-Fragmente gegen human TNF wurde unter in-vivo-Bedingungen in männlichen Balb/c-Mäusen untersucht. 4-6 Wochen alte Mäuse wurden randomisiert und in Gruppen von 5 bzw. 10 Tieren aufgeteilt. Die Substanzen wurden intravenös in die laterale Schwanzvene gegeben (Applikationsvolumen 10 ml/kg). 24 h vor der rhu TNF- α -Applikation wurden die Tiere mit LPS 0,5 mg/kg i.v. "geprimed". TNF- α und LPS wurden vor der Injektion in Puffer A (150 mM NaCl und 0,18 % Rinderserumalbumin (Sigma, RIA-grade)), gelöst. Zur Messung der Neutralisierung wurde zuerst TNF gegeben, die mAK-Fragmente 15-30 min danach. Die Tötungsraten wurden nach 24 h bestimmt. In diesem Versuch zeigen die Fragmente eine starke Neutralisation von humanem TNF- α .

Beispiel 3

a) Herstellung von F(ab)₂-Fragmenten

Der monoklonale Antikörper mAK 195 wurde bei pH 4,5 in Gegenwart von 0,5M NaCl mit Pepsin gespalten (30 μ g Pepsin/mg mAb; 90 min; 37 °C). Ausfallende Fc-Fragmente wurden abzentrifugiert und der Überstand über eine Sephacryl® S-200 Gelfiltrationssäule (1,5 cm x 75 cm) chromatografiert. Die F(ab)₂-Fragmente enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und zur Entfernung von

Antikörperresten über Protein-A Sepharose® filtriert.

b) Herstellung von Fab-Fragmenten

Der monoklonale Antikörper mAK 195 wurde bei pH 8,0 in Gegenwart von 0,5M NaCl mit Cystin-aktiviertem Papain (10 μ g/mg mAb; 4 h; 37 °C) gespalten. Anschließend wurde das Papain durch Zugabe von 20 mM Jodacetamid inaktiviert und das Gemisch über eine Sephacryl® S-200 Gelfiltrationssäule (1,5 cm x 75 cm) getrennt. Die Fab-Fragmente enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und zur Entfernung der Fc-Fragmente über Protein A Sepharose® filtriert.

Die Bezeichnungen "Sephacryl" und "Sepharose" sind Warenzeichen der Firma Pharmacia.

Ansprüche

1. F(ab)₂- und/oder F(ab)-Fragmente des monoklonalen Antikörpers mAK 195.

2. F(ab)₂- und/oder F(ab)-Fragmente des monoklonalen Antikörpers mAK 195 zur Verwendung bei der Bekämpfung von Krankheiten.

-1- * -

C12P21/08F

⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 350 690
A3**

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑪ Anmeldenummer: 89111538.8

⑤ Int. Cl.⁵: C07K 15/06, A61K 39/395

⑫ Anmeldetag: 24.06.89

⑬ Priorität: 14.07.88 DE 3823804

⑭ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
17.01.90 Patentblatt 90/03

⑮ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE

⑯ Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 04.07.90 Patentblatt 90/27

⑰ Anmelder: BASF Aktiengesellschaft
Carl-Bosch-Strasse 38
D-6700 Ludwigshafen(DE)

⑱ Erfinder: Moeller, Achim, Dr.
Wilhelm-Busch-Strasse 51
D-6703 Limburgerhof(DE)
Erfinder: Emiling, Franz, Dr.
Valentin-Bauer-Strasse 22
D-6700 Ludwigshafen(DE)
Erfinder: Kurfuerst, Manfred, Dr.
Anillinstrasse 71
D-6733 Hassloch(DE)
Erfinder: Meyer, Thomas, Dr.
Gruenerstrasse 14 a
D-6700 Ludwigshafen(DE)

② Neutralisation der in vitro- und in vivo-toxischen Eigenschaften von TNF-alfa durch monoklonale Antikörper und die davon abgeleiteten Fragmente.

③ Es werden Fragmente des monoklonalen Antikörpers MAK 195 beschrieben, die sich zur Bekämpfung von Krankheiten eignen.

EP 0 350 690 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 89 11 1538

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
D,Y	EP-A-0 260 610 (BASF A.G.) * Ansprüche 4,7,12; Seite 3, Zeilen 6-7,37-43; Beispiel 3 * ---	1,2	C 07 K 15/06 A 61 K 39/395
D,Y	NATURE, Band 330, 17. Dezember 1987, Seiten 662-664, London, GB; K.J. TRACEY et al.: "Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia" * Seite 662, rechte Spalte, Zeilen 4-13 * ---	1,2	
E	EP-A-0 355 067 (CELLTECH LTD) * Ansprüche 1-3; Spalte 2, Zeilen 22-46 * -----	1,2	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
			A 61 K C 12 P
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 10-04-1990	
		Prüfer RYCKEBOSCH A.O.A.	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			